

УДК 595.771 : 579.88 : 591.61

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ
ГОРОДСКОГО КОМАРА *CULEX PIPPIENS PIPPIENS* F. *MOLESTUS*
(DIPTERA, CULICIDAE)**

© Е. В. Шайкевич, Е. Б. Виноградова

Рассмотрены молекулярно-генетические методы дифференциации 2 экотипов, или форм (*pipiens* и *molestus*), комаров *Culex pipiens pipiens* — активных кровососов людей и переносчиков возбудителей заболеваний. Для анализа ДНК использованы 2 популяции городского комара из подвалов С.-Петербурга и Москвы (экотип *molestus*) и 2 популяции из наземных водоемов Ленинградской обл. и Подмосковья (экотип *pipiens*). Экотипы различаются 6 заменами среди 247 нуклеотидов мтДНК 3' конца гена цитохромоксидазы I (COI), вариантами фрагментов мтДНК, полученными при рестрикционном анализе, и размером ПЦР продуктов ITS2 последовательностей рибосомной ДНК.

Комары *Culex pipiens* представляют серьезную проблему как активные кровососы и переносчики возбудителей серьезных заболеваний человека и животных, особенно в тропических странах; среди них лимфатический филяриатоз и ряд арбовирусных инфекций — западный лошадиный энцефалит в США, японский — в Азии, энцефалит Сан-Луи в Северной и Южной Америках, лихорадка долины Рифт в Африке и протозойные заболевания. Эти комары служат одним из переносчиков западно-нильского энцефалита в Африке, Индии и Израиле. В 1996 г. вспышка этого заболевания наблюдалась в Бухаресте (Ceianu et al., 2001), в 1999 г. в Нью-Йорке (Petersen et al., 2002) и Волгограде, а также в Астраханской обл. (Бутенко и др., 2001). Эпидемиология заболевания в Европе имеет свои особенности, при этом большую опасность представляет распространение инфекции среди городского населения комарами *C. p. pipiens* f. *molestus* (Hubalek, 2000). Комары *C. p. pipiens* являются носителями возбудителя боррелиоза (Halouzka, 1993; Сарсова et al., 2002), а также вируса гепатита С (Hassan et al., 2003).

Главными представителями *C. pipiens* являются *C. p. pipiens*, распространенный преимущественно в умеренном поясе, и *C. p. quinquefasciatus*, встречающийся в субтропиках и тропиках (некоторые авторы считают последний видом). *C. p. pipiens* включает 2 формы, или экотипа — *pipiens* и *molestus*, которые характеризуются небольшими морфологическими и значительными биологическими отличиями. Экотип *molestus*, или городской (подвальный) комар, размножается круглогодично в подтопленных водой подвалах и доставляет укусами большое беспокойство населению городов и поселков (Виноградова, 1997). Это автогенные, стеногамные и недиапаузирующие комары. Напротив, экотип *pipiens* — неавтогенные, эвригамные и диапаузирующие комары.

Вопрос идентификации двух форм комаров, имеющий как научное, так и практическое значение, ставился уже давно. Из морфологических признаков наиболее ценное диагностическое значение имеет средняя величина сифонального индекса личинок, позволяющая удовлетворительно различать формы на популяционном уровне, хотя при определении отдельных особей иногда могут возникать трудности (Vinogradova, 2000).

С конца 1970-х годов стали разрабатываться и другие методы внутривидовой диагностики комаров *C. pipiens* — изоферментный и дискриминантный анализы и некоторые другие (Виноградова, 1997), но и они окончательно не решили вопрос идентификации форм.

В последние годы интенсивно развиваются молекулярная филогенетика и систематика, разрабатываются новые методы анализа молекулярных маркеров ДНК. Сравнительный анализ молекулярно-генетической организации видов является сейчас распространенным подходом при изучении родственных взаимоотношений видов и подвидов и при изучении эволюционного процесса в популяциях. В связи с большим медико-ветеринарным значением активно изучаются геномы представителей рода *Culex* с целью идентификации самих переносчиков и возбудителей заболеваний (Toma et al., 2000; Aspen et al., 2003; Kent et al., 2003). Для анализа традиционно используются вариабельные последовательности внутренних транскрибируемых спейсеров рибосомной ДНК (Crabtree et al., 1995; Miller et al., 1996; Severini et al., 1996).

Методом ПЦР изучено распространение цитоплазматически наследуемой симбиотической бактерии *Wolbachia pipientis*, ответственной за цитоплазматическую несовместимость подвидов и популяций, у природных популяций *C. p. pipiens* из разных биотопов в России (Виноградова и др., 2003) и Германии (Mahilum et al., 2003). В первом случае *Wolbachia* обнаружена у комаров экотипа *molestus* и отсутствует у экотипа *pipiens*. Была исследована изменчивость мтДНК, так как известна корреляция между типом мтДНК и бактериальными симбионтами (Schulenburg von der et al., 2002), и ДНК рибосомного кластера генов в качестве хромосомного маркера. Сравнительный анализ последовательностей 3' конца гена цитохромоксидазы I (они секвенированы и зарегистрированы в GenBank под номерами AJ557889, AJ557890, AJ 557892) показал, что комары экотипа *molestus* (из С.-Петербурга и Москвы) и экотипа *pipiens* (из Ленинградской обл. и Подмосковья) отличаются 6 заменами среди 247 нуклеотидов. Причем нуклеотидные последовательности популяций комаров соответствующих экотипов идентичны между собой, несмотря на значительную удаленность мест сбора друг от друга. Из 6 замен 5 транзиций — тимин меняется на цитозин, а один раз трансверсия, аденин заменяется тиминном, но все эти замены не влияют на функции гена цитохромоксидазы I (Виноградова и др., 2003).

Настоящая работа посвящена дальнейшей разработке молекулярно-генетических методов (сравнение размеров ПЦР продуктов и рестрикционный анализ) для дифференциации двух экотипов комаров *C. p. pipiens*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Материалом служили личинки комаров, собранные в подвалах С.-Петербурга и Москвы, представлявшие экотип *molestus* (автогенные комары). Личинки комаров экотипа *pipiens* (неавтогенные комары) происходили из открытых водоемов Ленинградской обл. (окрестности пос. Сосново) и Подмо-

сковья (Солнечногорский р-н, 25 км от кольцевой дороги). Определение комаров разных экотипов производилось по совокупности морфологических (средний сифональный индекс личинок) и биологических признаков, включающих прежде всего автогенность, а также стено- и эвригамность и в некоторых случаях способность диапаузировать.

Выделение ДНК из личинок комаров, ПЦР, электрофорез, проводили по стандартным методикам, описанным ранее (Виноградова и др., 2003). Для анализа митохондриальных генов использовали праймеры, специфичные к ДНК 3' конца гена цитохромоксидазы I *Drosophila yakuba* (Juan et al., 1996). Для амплификации рибосомных генов использовали праймеры, комплементарные к 5.8S и 28S рДНК (Proft et al., 1999). ПЦР проводили на амплификаторе BIOKOM Amply 4 при следующих условиях: начальная денатурация — 2 мин при 95 °С; 35 циклов: 95 °С — 30 сек, 55 °С — 30 сек, 72 °С — 45 сек; заключительный синтез — 10 мин при 72 °С. Для рестрикции использовали 10 мкл амплификата и фермент SspI (Fermentas) по прилагаемой к рестриктазе методике.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Принимая во внимание, что секвенирование является довольно дорогим и не всегда доступным методом исследования, и разницу в нуклеотидном составе изученного нами участка гена цитохромоксидазы I мтДНК у *moles-tus* и *pipiens* было решено подобрать рестриктазу, которая имела бы сайт рестрикции на последовательности только одного типа мтДНК. Используя программу Webcutter 2.0, нам удалось выбрать фермент SspI. Этой рестриктазе требуется последовательность узнавания ААТ'АТТ. В последовательности ДНК экотипа *moles-tus* такой участок есть, тогда как у экотипа *pipiens* последний тимин заменяется на цитозин, и рестриктаза не работает. Этим методом было проверено по 20 ДНК особей из автогенных популяций С.-Петербурга и Москвы и неавтогенных популяций из окрестностей пос. Сосново Ленинградской обл. и Солнечногорского р-на Подмосковья. ПЦР фрагменты после амплификации с праймерами UEA9 и UEA10 обрабатывались ферментом рестрикции SspI по стандартной методике в течение 1.5 ч. Результаты эксперимента проверяли электрофорезом в 2%-ном агарозном геле. После рестрикции ДНК автогенных комаров была представлена двумя фрагментами, размером примерно 220 и 90 пар нуклеотидов (п. н.). ДНК же неавтогенных комаров оставалась не измененной — 311 п. н. (рис. 1, см. вкл.). Среди 20 проверенных образцов ДНК популяции комаров из пос. «69 км» мы обнаружили 2 исключения. ПЦР фрагменты ДНК, выделенной из двух личинок, при обработке SspI разрезались на те же 2 фрагмента, что и ДНК автогенных комаров. После секвенирования амплификатов этих образцов мы обнаружили точечные замены нуклеотидов (транзиции тимин-цитозин) в трех местах последовательностей, одна из которых восстанавливает сайт рестрикции SspI (рис. 2, «Лен. обл. 3» и «Лен. обл. 4»). Другие 5 замен нуклеотидов, отличающих ДНК комаров экотипа *moles-tus* от ДНК экотипа *pipiens*, у этих двух личинок соответствуют последовательностям ДНК экотипа *pipiens* из Ленинградской обл. и Подмосковья. Таким образом, у этих двух личинок экотипа *pipiens* ДНК гена цитохромоксидазы I отличается от ДНК комаров экотипа *moles-tus* 7 заменами нуклеотидов, 5 из которых совпадают со всеми остальными проверенными образцами. Всего методом рестрикции было проверено 90 образцов мтДНК

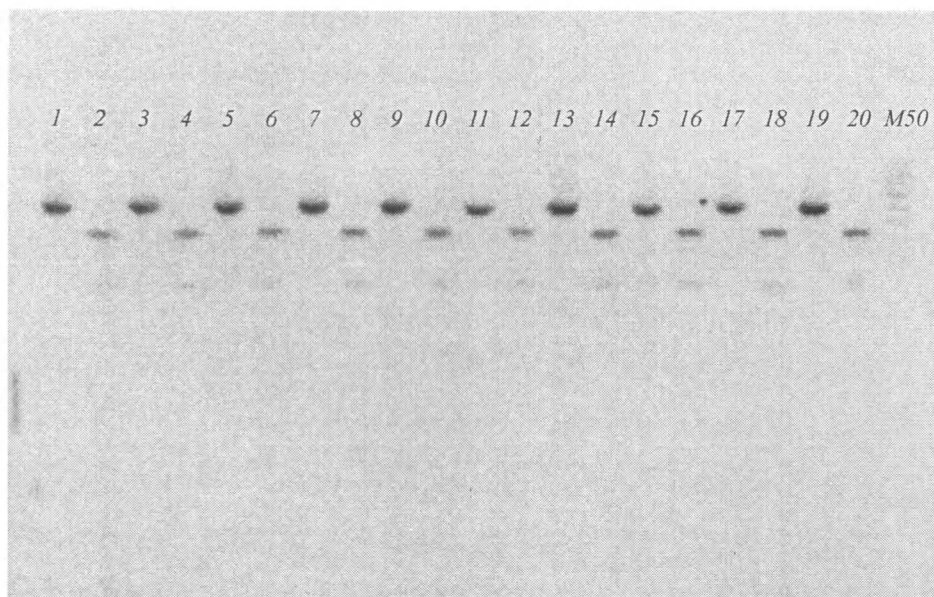


Рис. 1. Электрофореграмма рестрикции продуктов ПЦР участка гена цитохромоксидазы I у комаров *C. p. pipiens*.

ДНК комаров экотипа *pipiens* из Ленинградской обл. (1, 3, 5, 7, 9) и Подмосковья (11, 13, 15, 17, 19). ДНК комаров экотипа *molestus* из С.-Петербурга (2, 4, 6, 8, 10) и Москвы (12, 14, 16, 18, 20).

Fig. 1. Electrophoreprogram of PCR products for the gene of cytochrome oxidase I from *Culex pipiens pipiens* mosquitoes.

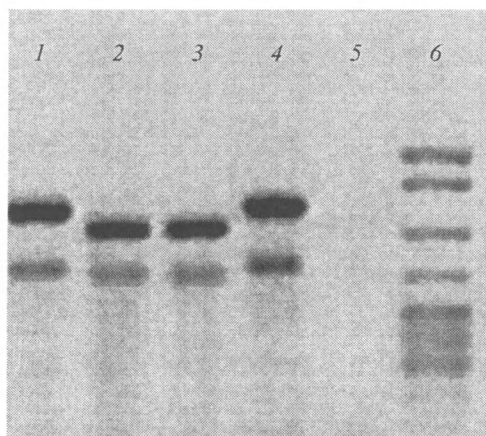


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов ПЦР ITS2 участка рибосомных генов комаров *C. p. pipiens*.

1 — ДНК комара экотипа *molestus* из С.-Петербурга, 2 — ДНК комара экотипа *pipiens* из Ленинградской обл., 3 — ДНК комара экотипа *pipiens* из Подмосковья, 4 — ДНК комара экотипа *molestus* из Москвы, 5 — отрицательный контроль, 6 — маркер молекулярного веса pBR322/MspI (622, 527, 404, 309, 242—238, 217, 201—180).

Fig. 3. Electrophoreprogram of PCR products for ITS2 fragment of ribosomal genes of *Culex pipiens pipiens* mosquitoes.

			SspI
Петербург	W+	AGCAGGAATACCACGACGATATTCTGATTTTCCAGATAGTTACTTAGCATGAAATATTGT	
Москва	W+	AGCAGGAATACCACGACGATATTCTGATTTTCCAGATAGTTACTTAGCATGAAATATTGT	
Лен. обл. 1	W-	AGCAGGAATACCTCGACGATACTCTGATTTTCCAGATAGTTATTTAGCATGAAATATCGT	
Моск. обл.	W-	AGCAGGAATACCTCGACGATACTCTGATTTTCCAGATAGTTATTTAGCATGAAATATCGT	
Лен. обл. 3	W-	AGCAGGAATACCTCGACGATACTCTGATTTTCCAGATAGTTATTTAGCATGAAATATTGT	
Лен. обл. 4	W-	AGCAGGAATACCTCGACGATACTCTGATTTTCCAGATAGTTATTTAGCATGAAATATTGT	

Петербург	W+	TTCATCATTAGGTAGAACAATTTTCATTATTTGGAATTGTATTCTTTTATTATTATTG	
Москва	W+	TTCATCATTAGGTAGAACAATTTTCATTATTTGGAATTGTATTCTTTTATTATTATTG	
Лен. обл. 1	W-	TTCATCACTAGGTAGAACAATTTTCATTATTTGGAATTGTATTCTTTTATTATTATTG	
Моск. обл.	W-	TTCATCACTAGGTAGAACAATTTTCATTATTTGGAATTGTATTCTTTTATTATTATTG	
Лен. обл. 3	W-	TTCATCACTAGGTAGAACAATTTTCATTATTTGGAATTGTATTCTTTTATTATTATTG	
Лен. обл. 4	W-	TTCATCACTAGGTAGAACAATTTTCATTATTTGGAATTGTATTCTTTTATTATTATTG	

Петербург	W+	AGAAAGTATAATTTCTCAACGAACACCTTCATTCCCTATACAATTATCATCATCAATTGA	
Москва	W+	AGAAAGTATAATTTCTCAACGAACACCTTCATTCCCTATACAATTATCATCATCAATTGA	
Лен. обл. 1	W-	AGAAAGTATAATTTCTCAACGAACACCTTCATTCCCTATACAATTATCATCATCAATTGA	
Моск. обл.	W-	AGAAAGTATAATTTCTCAACGAACACCTTCATTCCCTATACAATTATCATCATCAATTGA	
Лен. обл. 3	W-	AGAAAGTATAATTTCTCAACGAACACCTTCATTCCCTATACAATTATCATCATCAATTGA	
Лен. обл. 4	W-	AGAAAGTATAATTTCTCAACGAACACCTTCATTCCCTATACAATTATCATCATCAATTGA	

Петербург	W+	ATGATATCATACTCTTCCACCTGCAGAACATACATATGCAGAACTTCCATTATTATCATC	
Москва	W+	ATGATATCATACTCTTCCACCTGCAGAACATACATATGCAGAACTTCCATTATTATCATC	
Лен. обл. 1	W-	ATGATATCATACTCTTCCACCTGCAGAACATACATATGCAGAACTTCCACTATTATCATC	
Моск. обл.	W-	ATGATATCATACTCTTCCACCTGCAGAACATACATATGCAGAACTTCCACTATTATCATC	
Лен. обл. 3	W-	ATGATACCATACTCTTCCACCTGCAGAACATACATATGCAGAACTTCCACTATTATCATC	
Лен. обл. 4	W-	ATGATACCATACTCTTCCACCTGCAGAACATACATATGCAGAACTTCCACTATTATCATC	

Петербург	W+	TAATTTT	
Москва	W+	TAATTTT	
Лен. обл. 1	W-	TAATTTT	
Моск. обл.	W-	TAATTTT	
Лен. обл. 3	W-	TAATTTT	
Лен. обл. 4	W-	TAATTTT	

Рис. 2. Нуклеотидные последовательности участка гена цитохромоксидазы I у комаров *C. p. pipiens* из разных мест.

Звездочками отмечены одинаковые нуклеотиды. W+ и W- — присутствие или отсутствие эндосимбионта вольбахии.

Fig. 2. Nucleotid sequences of the gene cytochrome oxidase I from *Culex pipiens pipiens* mosquitoes from different areas.

из разных популяций *C. pipiens* России и во всех случаях, кроме двух описанных выше, действию рестриктазы подвергалась только ДНК комаров экотипа *molestus*. Таким образом, несмотря на 2 обнаруженных исключения (4 % изученных личинок), рестрикционный анализ мтДНК с использованием фермента SspI может в большинстве случаев использоваться для диагностики двух форм *C. pipiens*.

Второй подход, использованный нами, — анализ размера ПЦР фрагментов ITS2 последовательностей рДНК. Рибосомные гены эукариот организованы в виде tandemно повторяющихся последовательностей, локализованных в одной или нескольких хромосомах. Каждый повтор содержит гены рибосомных РНК. У *C. pipiens* кластер рибосомных генов локализован в I хромосоме и числе генов в нем составляет примерно 87 на гаплоидный ге-

ном. Гены рРНК разделены промежуточными последовательностями (спейсерами): нетранскрибируемым (IGS), внешним транскрибируемым (ETS) и внутренними транскрибируемыми спейсерами (ITS). IGS разделяет повторяющиеся транскрибируемые последовательности, ETS располагается между промотором и 18S геном, ITS1 локализуется между 18S и 5.8S генами, ITS2 между 5.8S и 28S генами. Посредством РНК-полимеразы I транскрибируется 45S предшественник 18S, 5.8S и 28S рРНК. Созревание первичного транскрипта заключается в вырезании и удалении спейсерных последовательностей (Муха и др., 1999).

Для различных структурных элементов кластера рибосомных генов характерна разная степень эволюционного консерватизма. Наиболее консервативны структурные элементы генов рРНК, а спейсерные последовательности — вариабельны. Поэтому праймеры для полимеразной цепной реакции подбираются на консервативные области рДНК, а сравнение между видами проводят, анализируя вариабельные последовательности спейсеров. Мы использовали праймеры, комплементарные 5.8S и 28S генам рРНК, амплифицирующие область второго внутреннего транскрибируемого спейсера, фланкируемого 91 п. н. 5.8S области и 39 п. н. 28S области рДНК (Proft et al., 1999). Известно, что ITS2 область у представителей рода *Culex* варьирует, составляя 269—282 (п. н.) у *C. tarsalis*, 275 — у *C. nigripalpus*, 276—283 — у *C. restuans*, 254—275 — у *C. erythrothorax*, 289—291 — у *C. salinarius*, 267—272 — у *C. torrentium*, 318—329 — у *C. pipiens*, 317—333 — у *C. quinquefasciatus* и 322 — у *C. p. pallens*, (Miller et al., 1996). Эти авторы считают *C. quinquefasciatus* самостоятельным видом).

Размер ПЦР фрагментов ITS2 районов у комаров экотипов *pipiens* и *molestus* из изучаемых нами мест сбора составляли примерно 410 и 460 п. н. соответственно и различались примерно на 50 п. н. (рис. 3, см. вкл.). Однако известно, что ДНК этих же экотипов из США в области ITS 2 отличаются лишь несколькими заменами нуклеотидов (Miller et al., 1996).

Таким образом, 2 формы *C. p. pipiens* (*pipiens* и *molestus*) на севере европейской части России отличаются наличием эндосимбиотической бактерии *W. pipiens* в клетках, 6 заменами нуклеотидов в области митохондриальной ДНК и размером ПЦР продукта рибосомной ДНК. Известно, что вольбахией заражено 95—98 % подвальных комаров. Разница в нуклеотидном составе гена цитохромоксидазы I мтДНК и в размерах ПЦР фрагментов ITS2 рДНК сохраняется и у особей экотипа *molestus*, потерявших вольбахию. Предложенные молекулярно-генетические методы (рестрикционный анализ мтДНК и определение размеров ПЦР фрагментов ITS2 рДНК) могут использоваться в медицинской энтомологии для определения принадлежности отдельных особей к той или другой форме *C. p. pipiens*, что имеет большое практическое значение в связи с актуальной проблемой городских комаров, широко распространенных в России и других странах.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 02-04-49703 и № 00-15-97777), а также гранта поддержки ведущих научных школ (научная школа И. А. Захарова) НШ-827.2003.4.

Список литературы

- Бутенко А. М., Ковтунов А. И., Джаркенов А. Ф., Злобина Л. В., Гришанова А. П., Азарян А. Р., Ларичев В. Ф., Шишкина Е. О., Львов Д. К. Эпидемиологическая характеристика западно-нильского вируса в Астраханской области // Вопросы вирусологии. 2001. Т. 46, № 4. С. 34—35.
- Виноградова Е. Б. Комары комплекса *Culex pipiens* в России // Тр. Зоол. ин-та РАН. 1997. Т. 271. С. 1—307.
- Виноградова Е. Б., Федорова М. В., Шайкевич Е. В., Захаров И. А. Эндосимбиотическая бактерия *Wolbachia pipiens* в синантропных популяциях комаров *Culex pipiens pipiens* L. (Diptera, Culicidae) // Докл. Академии РАН. 2003. Т. 389, № 6. С. 1—5.
- Муха Д. В., Вигманн Б. М., Шал К. Сальтационные изменения в структуре кластера рибосомных генов в процессе эволюции тараканов рода *Blattella* // ДАН. 1999. Т. 364(1). С. 134—139.
- Aspen S., Crabtree M. B., Savage H. M. Polymerase chain reaction assay identifies *Culex nigripalpus*: Part of an assay for molecular identification of the common *Culex* (Culex) mosquitoes of the eastern United States // J. Am. Mosq. Control Ass. 2003. Vol. 19, N 2. P. 115—120.
- Capcova L., Zakovska A., Knoz J., Dendis M., Sery O. Further findings of spirochaetal microorganisms in mosquitoes and ticks in the Czech Republic // Biologia (Bratislava). 2002. Vol. 57, N 3. P. 389—394.
- Ceianu C. S., Ungureanu A., Nicolescu G., Cernescu C., Nitescu L., Tardei G., Petrescu A., Pitigoi D., Martin D., Ciulacu V., Vladimirescu A., Savage H. M. West Nile virus surveillance in Romania: 1997—2000 // Viral Immunology. 2001. Vol. 14, N 3. P. 251—262.
- Crabtree M. B., Savage H. M., Miller B. R. Development of a species-diagnostic polymerase chain reaction assay for the identification of *Culex* vectors of St. Louis encephalitis virus based on interspecific sequence variation in ribosomal DNA spacers // Am. J. Trop. Med. Hyg. 1995. Vol. 53, N 1. P. 105—109.
- Halouzka J. *Borreliae* in *Aedes vexans* and hibernating *Culex pipiens molestus* mosquitoes // Biologia (Bratislava). 1993. Vol. 98, N 2. P. 123—124.
- Hassan M. I., Mangoud A. M., Etewa S., Amin I., Morsy T. A., El-Hady G., El-Besher Z. M., Hammad K. Experimental demonstration of hepatitis C virus (HCV) in an Egyptian strain of *Culex pipiens* complex // J. Egypt. Soc. Parasitol. 2003. Vol. 33, N 2. P. 373—384.
- Hubalek Z. European experience with the West Nile virus ecology and epidemiology. Could be relevant for the New World? // Viral Immunology. 2000. Vol. 13, N 4. P. 415—426.
- Juan C., Omori P., Hewitt G. M. Phylogeny of the genus *Hegeter* (Tenebrionidae, Coleoptera) and its colonization of the Canary Islands deduced from Cytochrome Oxidase I mitochondrial DNA sequences // Heredity. 1996. Vol. 76. P. 392—403.
- Kent R. J., Harrington L. C., Norris D. E. Development of a molecular diagnostic to distinguish *Culex pipiens pipiens* and *Culex pipiens molestus* // Am. J. Trop. Med. Hyg. 2003. Vol. 69 (3 suppl.). P. 446.
- Mahilum M. M., Storch V., Becker N. Molecular and electron microscopic identification of *Wolbachia* in *Culex pipiens* complex populations from the Upper Rhine Valley, Germany, and Cebu city, Philippines // J. Am. Mosq. Control Assoc. 2003. Vol. 19, N 3. P. 206—210.
- Miller B. R., Crabtree M. B., Savage H. M. Phylogeny of fourteen *Culex* mosquito species, including the *Culex pipiens* complex, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA // Insect Mol. Biol. 1996. Vol. 5, N 2. P. 93—107.
- Petersen L. R., Campbell G. L., Marfin A. A. West Nile virus (WNV) in the United States // Infection. 2002. Vol. 30 (Suppl. 1). P. 3.
- Proft J., Maier W. A., Kampen H. Identification of six sibling species of the *Anopheles maculipennis* complex (Diptera: Culicidae) by a polymerase chain reaction assay // Parasitol. Res. 1999. Vol. 85. P. 837—843.
- Severini C., Silvestrini F., Manchini P. et al. Sequence and secondary structure of the rDNA second internal transcribed spacer in the sibling species *Culex pipiens* L. and *C. quinquefasciatus* Say (Diptera, Culicidae) // Insect Mol. Biol. 1996. Vol. 5, N 3. P. 181—186.
- Toma T., Miyagi I., Crabtree M. B., Miller B. R. Identification of *Culex vishnui* subgroup (Diptera, Culicidae) mosquitoes from Ryukyu Archipelago Japan: Development of

- a species-diagnostic polymerase chain reaction assay based on sequence variation in ribosomal DNA spacers // J. Med. Ent. 2000. Vol. 37, N 4. P. 554—558.
- Vinogradova E. B. *Culex pipiens pipiens* mosquitoes: taxonomy, distribution, ecology, physiology, genetics, applied importance and control. Sofia—Moscow: Pensoft, 2000. 250 p.
- Schulenburg J. H. G. von der, Hurst G. D. D., Tetzlaff D., Booth G. E., Zakharov I. A., Majerus M. E. N. History of Infection With Different Male-Killing Bacteria in the Two-Spot Ladybird Beetle *Adalia bipunctata* Revealed Through Mitochondrial DNA Sequence Analysis // Genetics. 2002. Vol. 160. P. 1075—1086.

Институт общей генетики РАН,
Москва,
Зоологический институт РАН,
Санкт-Петербург

Поступила 10 III 2004

MOLECULAR GENETIC METHODS FOR THE IDENTIFICATION OF THE URBAN MOSQUITO *CULEX PIPENS PIPENS* F. MOLESTUS (DIPTERA, CULICIDAE)

E. V. Shaikevich, E. B. Vinogradova

Key words: *Culex pipiens pipiens*, *pipiens* and *molestus* ecotypes, identification, molecular methods, rDNA, mtDNA.

SUMMARY

Molecular genetic methods for the identification of two ecotypes, or forms (*pipiens* and *molestus*) of the *Culex pipiens pipiens* mosquitoes, which are known as active bloodsuckers and vectors of various agents of diseases, are proposed. For the DNA analysis, two populations of the urban mosquitoes (the *molestus* ecotype) from St. Petersburg and Moscow and two populations from the overground reservoirs in the Leningrad Province and neighboring areas of Moscow (the *pipiens* ecotype) have been studied. These ecotypes differ by six transitions among 247 nucleotide sequences of 3' part of the cytochrome oxidase subunit I (COI) gene of mitochondrial DNA (mtDNA), by the mtDNA fragments resulted from the restriction analysis and by the lengths of second internal transcribed spacer (ITS2) sequences in the ribosomal DNA.